

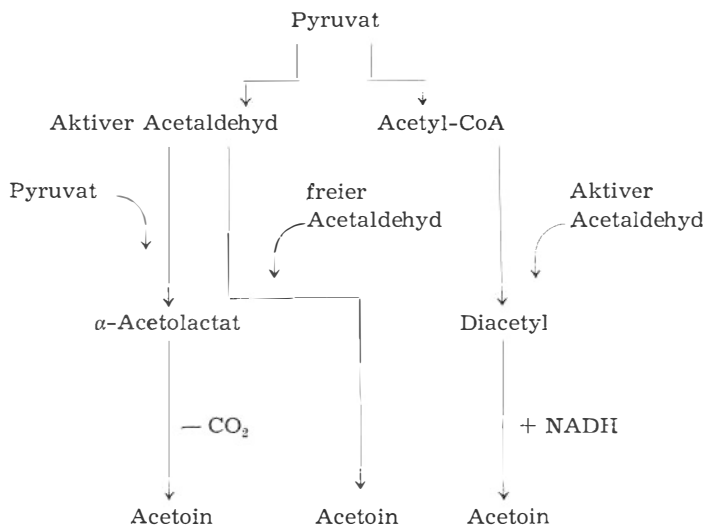
## Acetoin- und Diacetyl-Bildung einiger Lactobacteriaceae im Hinblick auf den Biologischen Säureabbau

von

R. ESCHENBRUCH\*

Der durch Milchsäurebakterien verursachte Äpfelsäureabbau (Biologischer Säureabbau) in Most und Wein wurde und wird noch in allen Weinbaugebieten der Welt intensiv untersucht (ausführliche Literatur bei RADLER, 1966). Zwei Kriterien haben sich dabei ergeben: Aufgrund der differierenden Sorten- und Lagenspezifitäten, der recht unterschiedlichen Behandlungsweise durch die Kellertechnik und des Trends zu immer restsüßeren Weinen unterliegen Most oder Wein — die üblicherweise verwendeten Substrate für Untersuchungen mit diesen Bakterien — erheblichen Schwankungen in der Ausgangszusammensetzung, z. B. Restzucker oder Säuregrad. Die Folge davon ist eine nur schwer mögliche Vergleich- und Reproduzierbarkeit der so gewonnenen Daten. Zum anderen war sehr oft eine mehr oder weniger ausgeprägte negative Geschmacksbeeinflussung des Weines zu beobachten.

Derartige Geschmacksfehler werden als „Milchsäureton“ oder im Extremfall als „Sauerkrautgeschmack“ bezeichnet (vgl. DITTRICH u. KERNER, 1964). Die Ursache hierfür sind hauptsächlich das Diketon Diacetyl bzw. 2,3-Butandion und das Acetoin bzw. Acetylmethylcarbinol. Beide Komponenten sind Gärungsnebenprodukte verschiedener Mikroorganismen und können aus Pyruvat über mehrere Reaktionswege entstehen (HOLZER *et al.*, 1961, 1962, SEITZ *et al.*, 1963, BUSSE u. KANDLER, 1961, SCHREIBER *et al.*, 1964, SPECKMANN u. COLLINS, 1966, 1968, CHUANG u. COLLINS, 1968, ESCHENBRUCH u. DITTRICH, 1970). Das folgende Schema veranschaulicht dies:



\* Herrn Prof. Dr. G. DREWS, Freiburg i. Br., Lehrstuhl für Mikrobiologie, danke ich für anregende Unterstützung dieser Arbeit.

Wesentliche Voraussetzung einer Acetoin- und Diacetylsynthese bei Hefen (DITTRICH u. ESCHENBRUCH, 1965) wie auch bei Milchsäurebakterien (BUSSE u. KANDLER, 1961) ist ein hoher Pyruvat Spiegel. Die hohe Michaeliskonstante, die DOLIN u. GUN-SALUS (1951) bei *Streptococcus faecalis* nachwiesen, macht dies verständlich.

Aus Einzeluntersuchungen ist zudem bekannt, daß Zeitpunkt und Größe der Acetoin- und Diacetylsynthese deutlich verschieden sein können. Bei Hefen wies DITTRICH (1968) eine Acetoinbildung nur am Anfang der Gärung nach. BUSSE u. KANDLER (1961) fanden bei dem heterofermentativen Milchsäurebakterienstamm *Leuconostoc citrovorum* eine Acetoin Synthese erst nach der Glucosevergärung.

Hieraus ergeben sich folgende Fragen: Verhalten sich auch andere Milchsäurebakterien wie *L. citrovorum*? Bestehen Unterschiede in der Nebenproduktbildung zwischen homo- und heterofermentativen Stämmen? Welchen Einfluß hat die Höhe des Glucose- und Äpfelsäurespiegels?

BUSSE u. KANDLER (1961) bestimmten vereinfachend Acetoin und Diacetyl nicht getrennt, sondern zusammen. Da Diacetyl offenbar auf einem anderen Wege als Acetoin entsteht (SCHREIBER *et al.*, 1964, CHUANG u. COLLINS, 1968), erscheint diese Vereinfachung nicht mehr gerechtfertigt.

An jeweils zwei Stämmen beider Stoffwechselgruppen war daher mit Hilfe eines standardisierten Nährbodens mit verschiedenen Glucose- und Malatkonzentrationen Acetoin- und Diacetylbildung getrennt zu prüfen.

### Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden mit je einem Stamm der heterofermentativen *Leuconostoc citrovorum*, *Leuconostoc mesenteroides* und der homofermentativen *Streptococcus diacetylactis* und *Lactobacillus plantarum* durchgeführt<sup>1)</sup>. Als Nährmedium diente MRS-Lösung<sup>2)</sup> nach DE MAN *et al.* (1960) mit einem pH-Wert von 6,0–6,3, die 10 min bei 0,5 atü autoklaviert war. Gärgefäße waren 300 ml Erlenmeyerkolben mit Gärverschluß, die mit 200 ml Nährlösung beschickt wurden. Die Versuchsansätze wurden mit 1,0 ml einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur beimpft. Pyruvat, Acetaldehyd und L-Malat wurden bei der Beimpfung zugesetzt. Die Bebrütung erfolgte bei 25° C im Thermostaten. Jede Versuchsreihe bestand aus 6–10 Erlenmeyerkolben und wurde durchschnittlich zweimal wiederholt. Jeweils ein Kolben wurde in bestimmten Zeitabständen vom Versuchsbeginn an analysiert.

Acetoin und Diacetyl wurden photometrisch nach KIELHÖFER u. WÜRDIG (1960), die Milchsäure nach REBELEIN (1961) bestimmt. Glucose wurde titrimetrisch erfaßt nach HENNIG (1964). Acetaldehyd, Pyruvat, Malat enzymatisch nachgewiesen (BOEHRINGER, 1964, 1966). Das Wachstum wurde nephelometrisch mit einem Trübungsmeßeinsatz zum Photometer Elko III (Zeiss) gemessen. In den Abbildungen ist die Zunahme der Zellmasse als relativer Wert der optischen Dichte (O. D.) angegeben. Die Verwendung von O. D. als Maß für Wachstum erlaubte die Linearität der Beziehung von O. D. und Proteingehalt (LOWRY *et al.*, 1951).

### Ergebnisse

#### 1. Acetoin- und Diacetylbildung der heterofermentativen Stämme *L. mesenteroides* und *L. citrovorum*:

<sup>1)</sup> Herrn Dr. M. BUSSE, Bakteriologisches Institut, Freising-Weihenstephan, danke ich für die Überlassung der Stämme.

<sup>2)</sup> Abkürzungen: NAD = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, NADH = NAD reduziert, MRS = komplexes Nährmedium, *L. mesenteroides* bzw. *citrovorum* = *Leuconostoc mesenteroides* bzw. *citrovorum*, *Lb. plantarum* = *Lactobacillus plantarum*, *St. diacetylactis* = *Streptococcus diacetylactis*.

Wachsen beide Stämme in MRS-Substrat (2% Glucose), ist 60–70 Stunden nach Versuchsbeginn stationäres Wachstum erreicht. Die Glucose ist bis auf 500 mg/l verbraucht, der Milchsäurespiegel auf 25 g/l angestiegen, der pH-Wert auf 4,2 gesunken. Werden zusätzlich 4 g/l L-Malat zum MRS gegeben, wird nur 60% der Glucose abgebaut, L-Malat vollständig. Bereits nach Verbrauch von nur 12 g/l Glucose und 4 g/l L-Malat ist durch die gebildete Milchsäure der pH-Wert von 4,2 erreicht, unterhalb dessen beide Organismen keine Stoffwechselaktivität mehr zeigen. Eine Acetoin- und Diacetylbildung erbrachten beide Versuchsanordnungen nicht.

Erst wenn man *L. mesenteroides* und auch *L. citrovorum* ohne Glucose mit unterschiedlichen Mengen Äpfelsäure, Pyruvat oder Acetaldehyd kultiviert, werden beide Nebenprodukte gebildet (Tabellen 1 und 2).

Tabelle 1

Höchste Acetoin- und Diacetylkonzentrationen von *Leuconostoc mesenteroides* in glucosefreiem MRS sowie nach Zugabe von L-Malat, Pyruvat oder Acetaldehyd, gemessen nach 40–50 Stunden Bebrütung

MRS-Substrat glucosefrei	ohne Zusätze	L-Malat 4 g/l	nach Zusatz von		Acetaldehyd 200 mg/l
			Pyruvat 300 mg/l	500 mg/l	
Acetoin mg/l	1,6	2,0	2,5	5,9	1,8
Diacetyl mg/l	0,1	0,3	0,5	1,6	0,9
Milchsäure g/l	1,4	5,4	1,5	1,6	1,2
Wachstum (O. D.)	18	16	17	18	18

Tabelle 2

Höchste Acetoin- und Diacetylkonzentrationen von *Leuconostoc citrovorum* in glucosefreiem MRS sowie nach Zugabe von L-Malat, Pyruvat oder Acetaldehyd, gemessen nach 40–50 Stunden Bebrütung

MRS-Substrat glucosefrei	ohne Zusätze	L-Malat 4 g/l	nach Zusatz von	
			Pyruvat 100 mg/l	Acetaldehyd 200 mg/l
			L-Malat 4 g/l	
Acetoin mg/l	0,3	1,0	4,5	15,8
Diacetyl mg/l	0,15	0,20	0,93	—
Milchsäure g/l	1,3	5,0	4,1	1,5
Wachstum(O. D.)	12	17	17	53

Die höchsten Acetoin- und Diacetylkonzentrationen werden nach Zugabe von Pyruvat aber auch L-Malat und Acetaldehyd erreicht. Der Malatabbau bewirkt außerdem noch eine starke Erhöhung des Milchsäurepegels — ein typisches Zeichen des mikrobiellen Säureabbaues. Das Wachstum ist in allen Fällen im Vergleich zu unverändertem MRS auf 4–5% reduziert. Nur *L. citrovorum* ist offenbar in der Lage, aus der Acetaldehyd-Metabolisierung Energie zu gewinnen. Dieser Stamm bildet die dreifache Zellmasse.

In den Tabellen 1 und 2 sind nur die jeweiligen maximalen Konzentrationen beider Nebenprodukte angegeben. Verfolgt man jedoch die zeitlichen Abfolgen in der Synthese von Acetoin und Diacetyl, so erscheint ein differenzierteres Bild (Abb.

1 und 2). Danach durchlaufen beide ein Maximum, etwa dann, wenn das Wachstum stationär wird und Pyruvat verbraucht ist. Von diesem Zeitpunkt an nehmen bei *L. mesenteroides* beide Stoffe zunächst schnell ab, nach dem Malatverbrauch nur noch langsam. Bei *L. citrovorum* dagegen zeigt sich eine langsame und gleichmäßige Abnahme. Versuche, bei denen nur Pyruvat oder L-Malat oder Acetaldehyd eingesetzt wurden, ergaben grundsätzlich den gleichen Kurvenverlauf, jedoch nicht so ausgeprägt.

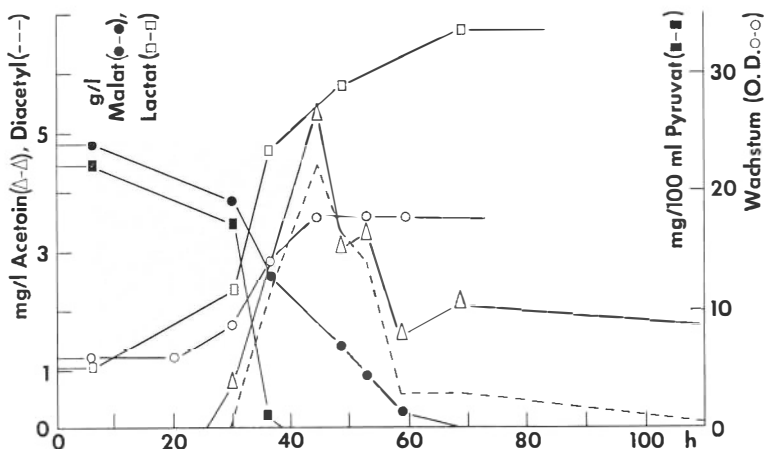


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Acetoin- und Diacetyl-Bildung von *L. mesenteroides* in MRS ohne Glucose nach Zusatz von 5 g/l L-Malat, 200 mg/l Pyruvat und 200 mg/l Acetaldehyd. Acetaldehyd ist nach ca. 40 h verbraucht, wie Pyruvat. Der Anfangs-pH steigt infolge des Malatabbaues von 4,7 auf 5,1.

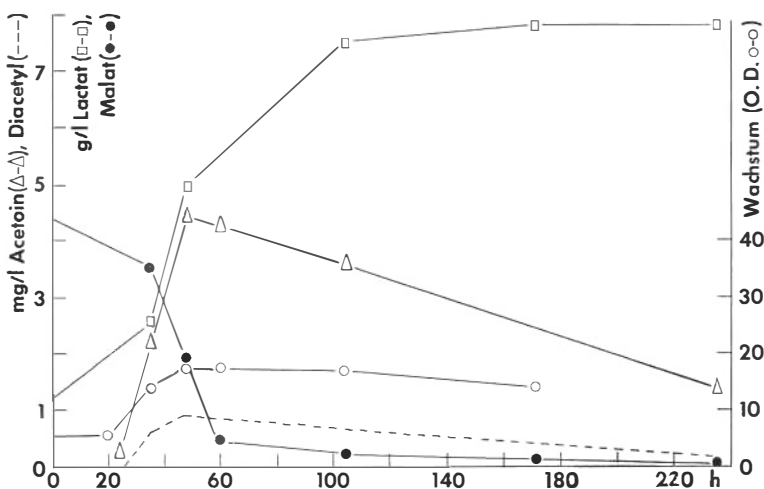


Abb. 2: Zeitlicher Verlauf der Acetoin- und Diacetyl-Bildung von *L. citrovorum* in MRS ohne Glucose nach Zugabe von 4,5 g/l L-Malat und 100 mg/l Pyruvat. Der pH-Wert steigt von 4,7 auf 5,1.

## 2. Nebenproduktbildung des homofermentativen Stammes *Streptococcus diacetylactis*:

Dieses Bakterium verhält sich deutlich anders als die beiden heterofermentativen Organismen. Bereits nach Verbrauch von 10 g/l Glucose ist auch die für diesen Stamm unterste pH-Grenze von 4,2 erreicht. Auffällig ist, daß — wenn Glucose im Nährmedium ist — hauptsächlich Diacetyl gebildet wird, Acetoin nur in Spuren (Tabelle 3). Kultiviert man *St. diacetylactis* ohne Glucose, so kehren sich die Verhältnisse um. Nur Acetoin wird nachweisbar, kein Diacetyl.

Tabelle 3

Maximale Acetoin-, Diacetyl- und Milchsäurekonzentrationen sowie Wachstum von *Streptococcus diacetylactis* in MRS mit und ohne Glucose.

MRS-Substrat	MRS mit 2% Glucose	MRS ohne Glucose
Wachstum (O. D.)	350	45
Acetoin mg/l	0,1	2,0
Diacetyl mg/l	1,7	—
Milchsäure g/l	21,0	1,7

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß auch nach Zugabe von L-Malat, Pyruvat oder Acetaldehyd immer nur Acetoin, aber kein Diacetyl faßbar wird. Das Wachstum ist wie bei den anderen Stämmen stark reduziert auf ca. 12% des normalen Ausmaßes. Der Äpfelsäureabbau mündet auch hier wieder in erhöhte Milchsäureproduktion.

Tabelle 4

Acetoin- und Milchsäurebildung von *Streptococcus diacetylactis* in glucosefreiem MRS nach Zugabe von Pyruvat, L-Malat oder/und Acetaldehyd

MRS-Substrat glucosefrei	Pyruvat 100 mg/l	nach Zugabe von	
		L-Malat 4 g/l	Pyruvat 100 mg/l L-Malat 4 g/l Acetaldehyd 200 mg/l
Wachstum (O. D.)	45	48	43
Acetoin mg/l	0,24	1,9	1,65
Diacetyl mg/l	—	—	—
Milchsäure g/l	1,73	4,80	4,80

Charakteristisch für diesen Stamm ist weiterhin, daß der einmal gebildete Nebenproduktspiegel nicht mehr abfällt und zugesetzte Metabolite nur sehr langsam verstoffwechselt werden (Abb. 3). Vergleichend werden somit in Ausmaß, Zeitpunkt und Substratabhängigkeit der Nebenproduktbildung recht deutliche Unterschiede gegenüber den heterofermentativen Stämmen sichtbar.

## 3. Acetoin- und Diacetylbildung des homofermentativen Stammes *Lactobacillus plantarum*:

In unverändertem MRS (2% Glucose) bildet *Lb. plantarum* im Gegensatz zu den anderen drei Stämmen bis 160 mg/l Acetoin, jedoch kein Diacetyl (Abb. 4). Überraschend war auch der zeitweilige Pyruvatstau, der dann zurückgeht, wenn sich Glucose zu erschöpfen beginnt. Außerdem ist das Absinken des pH-Wertes bis auf

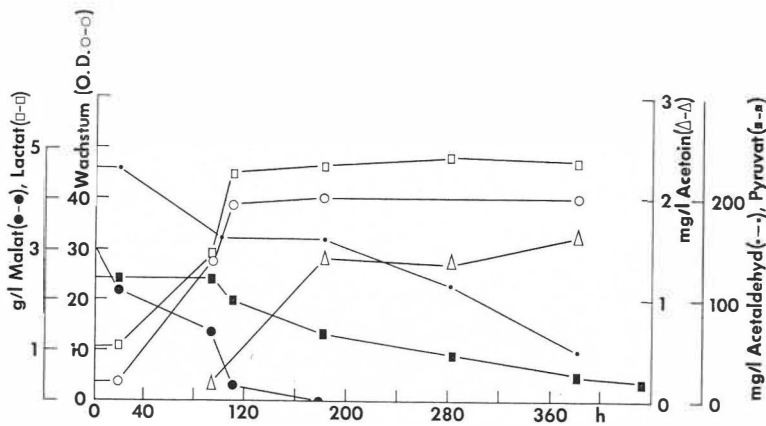


Abb. 3: Acetoinbildung von *St. diacetylactis* in MRS ohne Glucose nach Zugabe von 3 g/l L-Malat, 100 mg/l Pyruvat und 200 mg/l Acetaldehyd. Der pH-Wert steigt von 5,2 auf 5,6.

3,6 bemerkenswert, was auch noch in der sehr hohen Milchsäurekonzentration von annähernd 37 g/l zum Ausdruck kommt.

Fügt man zum MRS 5 g/l L-Malat und 100 mg/l Pyruvat, so wird trotz des niedrigen Ausgangs-pH von 4,8 die Glucose vollständig verbraucht. Wachstum und Lactatbildung sind unverändert, Diacetyl ist nicht nachweisbar (Abb. 5). Interessant ist der in diesem Diagramm aufgezeichnete Pyruvatverbrauch. Bis auf 50 mg/l werden die vorgegebenen 100 mg/l zunächst verbraucht. Zu diesem Zeitpunkt wird aber durch die intensive Glucosevergärung bereits mehr Pyruvat angeliefert als durchgesetzt werden kann. Die Pyruvatkonzentration nimmt folglich zu und wird dann schnell wieder metabolisiert, wenn sich Glucose erschöpft.

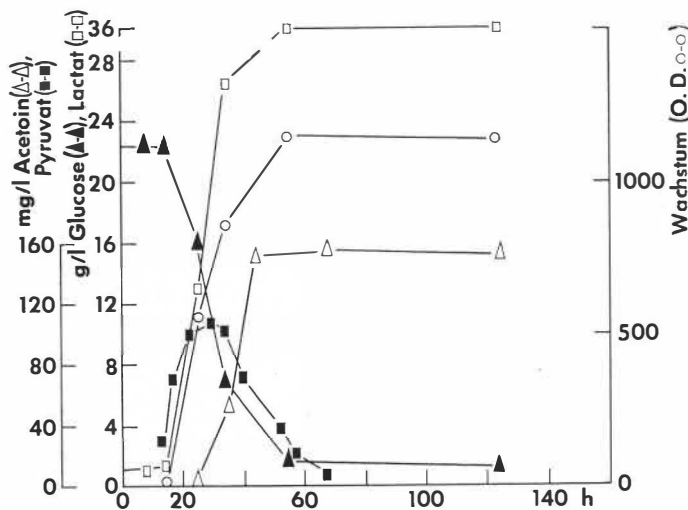


Abb. 4: Acetoinbildung und zeitweiliger Pyruvatrückstau bei *Lb. plantarum* in unverändertem MRS (2% Glucose).

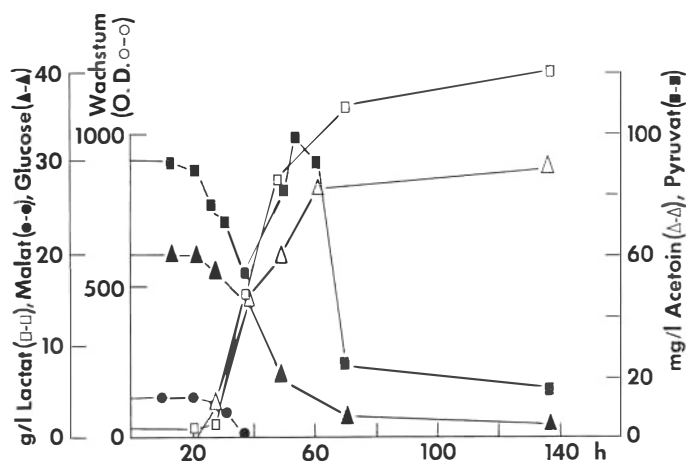


Abb. 5: Einfluß von 100 mg/l Pyruvat und 5 g/l L-Malat im MRS auf den zeitweiligen Pyruvatspiegel bei *Lb. plantarum*. Die Wachstumskurve wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet. Sie verläuft wie diejenige in Abb. 4.

Tabelle 5

Maximaler Acetoin-, Diacetyl- und Milchsäuregehalt bei *Lactobacillus plantarum* in MRS ohne Glucose und nach L-Malat-, Pyruvat- und Acetaldehydzugabe

MRS-Substrat glucosefrei	MRS ohne Glucose	L-Malat 5 g/l	Nach Zugabe von		
			L-Malat 5 g/l + Acetaldehyd 100 mg/l	L-Malat 5 g/l + Pyruvat 100 mg/l	L-Malat 5 g/l + Pyruvat 100 mg/l + Acetaldehyd 100 mg/l
Acetoin mg/l	2,0	13,6	30,3	88,4	113,8
Diacetyl mg/l	—	—	1,35	4,7	1,9
Milchsäure g/l	1,4	9,1	9,5	9,8	10,3
Wachstum (O. D.)	28	45	50	64	65

In Tabelle 5 sind die Veränderungen angegeben, die deutlich werden, wenn *Lb. plantarum* in glucosefreiem MRS und nach Zusatz von L-Malat, Pyruvat und Acetaldehyd kultiviert wird. Nur bei Acetaldehyd und/oder Pyruvatzusatz wird Diacetyl gebildet, Malat bewirkt nur eine Zunahme von Acetoin. Die Kombination aller drei Metabolite weist den höchsten Acetoingehalt auf, fast 70% der Menge, die bei Glucoseanwesenheit gebildet wird. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen zeigt *Lb. plantarum* nach Malatzugabe Wachstum und Stoffproduktion, Äpfelsäure kann offensichtlich für den Energiestoffwechsel genutzt werden. Dieses Bakterium bildet somit im Vergleich zu den vorher beschriebenen Stämmen hauptsächlich bei Glucoseanwesenheit Acetoin. Eine Abnahme des einmal gebildeten Nebenproduktspiegels ist auch bei diesem homofermentativen Stamm nicht erkennbar.

### Diskussion

Die untersuchten Stämme der Gattungen *Leuconostoc*, *Streptococcus* und *Lactobacillus* unterscheiden sich in der Nebenproduktbildung erheblich. Nicht nur zwischen homo- und heterofermentativen bestehen Unterschiede, sondern auch die homofermentativen *St. diacetylactis* und *Lb. plantarum* differieren.

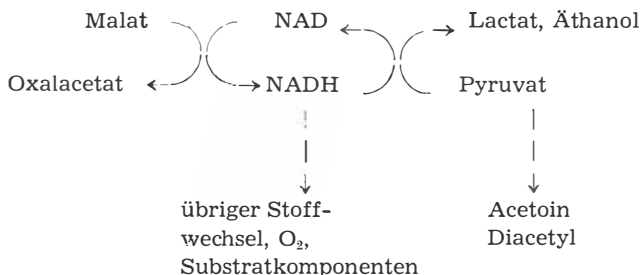
*L. citrovorum* und *L. mesenteroides* bilden weder Acetoin noch Diacetyl solange Glucose verfügbar ist. Auch variierende Glucosemengen von 2—0,2% und ein zusätzliches Angebot von Pyruvat bewirken keine Nebenproduktbildung. Das aus dem Glucoseabbau entstandene sowie das zugegebene Pyruvat werden offensichtlich rasch umgesetzt, d. h. es ist ausreichend NADH für die Reduktion des Pyruvates zu Milchsäure und auch Äthanol vorhanden.

Fehlt dagegen Glucose im Substrat, so werden Acetoin und Diacetyl gebildet. Zusätzliche Metaboliten, die mittelbar (Malat) und unmittelbar (Pyruvat, Acetaldehyd) den Pyruvatspiegel in der Zelle erhöhen können, steigern den Nebenproduktspiegel deutlich (Tabellen 1 und 2). Unter diesen Bedingungen ist der NADH-Gehalt wahrscheinlich sehr niedrig. Auch aus anderen Stoffwechselreaktionen dürfte in glucosereichem Medium nicht ausreichend Reduktionsäquivalent verfügbar sein. Es kann daher zu einem Pyruvatstau kommen. Acetoin- und Diacetylbildung wäre unter diesen Gesichtspunkten erklärlich.

Für diese Diacetylbildung erscheint noch ein anderes Moment wichtig. Diese Verbindung entsteht hauptsächlich über Acetyl-CoA. Bei starker Reduktion des Wachstums als Folge von Glucosemangel könnte es zu einer Anreicherung von Acetyl-CoA kommen und in deren Folge zur Diacetylbildung. Malat, Pyruvat und Acetaldehyd vergrößern in diesem Sinne auch das zur Diacetylbildung nötige Substratangebot, was sich in einer erhöhten Diacetylkonzentration äußert (Tabellen 1 und 2).

Der in den Abb. 1 und 2 dargestellte zeitliche Verlauf der Acetoin- und Diacetylbildung läßt eine Metabolisierung vermuten. Denkbar ist eine vollständige Reduzierung zu 2,3-Butandiol, wie sie bei Hefen abläuft. JUNI u. HEYM (1956) beschreiben dagegen für *Micrococcus* einen komplizierten Abbaumechanismus zu Essigsäure. Eine Klärung dieser Fragen soll in weiteren Untersuchungen versucht werden.

Vergleicht man in den Tabellen 1 und 2 den Einfluß von Malat auf die Nebenproduktbildung, so fällt auf, daß trotz hoher Malatgaben im Vergleich zu den wesentlich niedrigeren Pyruvat- und Acetaldehydzugaben relativ wenig Acetoin und Diacetyl gebildet werden. An Hand des folgenden Schemas sei ein möglicher Grund dafür erörtert:



Durch die Malatdehydrogenase wird Äpfelsäure zu Oxalessigsäure oxidiert, NAD wird dabei zu NADH reduziert. Oxalessigsäure decarboxyliert im weiteren Reaktionsverlauf zu Pyruvat. Mit der folgenden Reduktion des Pyruvates zu Milch-



säure und Äthanol ist die Reoxidation von NADH zu NAD gekoppelt. Dieser Zyklus erklärt zwanglos die Bildung von 7—8 g/l Lactat nach Malatzusatz, d. h. die Bewältigung der anfallenden Brenztraubensäure. Durch den Malatumsatz kommt es zu einer Erniedrigung des NAD/NADH-Quotienten und damit zu einem verstärkten Pyruvatumsatz zu Milchsäure und Äthanol.

Das durch die Malatdehydrierung gewonnene NADH wird aber wohl nicht ausschließlich zur Milchsäurebildung verwendet werden. Denkbar wäre z. B. eine Reaktion mit im Kulturgefäß noch vorhandenem Sauerstoff. Ebenso ist ein Bedarf des übrigen Zellstoffwechsels zu berücksichtigen. Daher kann es wahrscheinlich doch zu einem wenn auch geringen Pyruvatstau kommen. Die im Vergleich verhältnismäßig große Acetoin- und Diacetylausbeute nach Pyruvat- und Acetaldehydzugabe kann mit dem unter diesen Bedingungen fehlenden zusätzlichen Wasserstoffkreislauf erklärt werden.

Aus den bisher diskutierten Versuchsdaten läßt sich folgendes ableiten:

1. Im Gegensatz zu Hefen (DITTRICH, 1968) besteht bei *L. citrovorum* und *L. mesenteroides* keine Korrelation zwischen der Nebenproduktbildung und der Wachstumsrate. Nur unter stark reduzierten Wachstumsbedingungen wird bei ihnen eine Nebenproduktsynthese möglich. Für die Größe der Acetoinbildung ist offensichtlich das NAD/NADH-Verhältnis wichtig. Dies gilt für Hefen und die beiden *Leuconostoc*-Stämme gleichermaßen. Ein niedriger NADH-Spiegel und Acetoin entstehen bei Hefen nur in der Angärphase, wenn noch im Substrat Elektronenakzeptoren ( $O_2$ ) vorhanden sind. Die *Leuconostoc*-Stämme dagegen erreichen einen niedrigen NADH-Spiegel nur durch Verminderung des Angebotes an Wasserstoffdonatoren, d. h. in diesem Falle Glucose. In glucosefreiem Medium und nach Zugabe von Metaboliten kann es zu einem Pyruvatstau kommen. Hierdurch werden Bedingungen geschaffen ähnlich denen des mikrobiellen Säureabbaues in Most und Wein.

2. Das NAD/NADH-Verhältnis scheint auch die Bildung von Diacetyl zu beeinflussen, in der Weise, daß ein Pyruvatstau auch zu einem erhöhten aktivierten Acetaldehydgehalt, dem Reaktionspartner des Acetyl-CoA, führen könnte. Vom Überschuß beider ist abhängig, wieviel Diacetyl gebildet wird. Ein derartiger Überschuß könnte dann eintreten, wenn die für das Wachstum verantwortlichen Prozesse zwar wirksam zu werden beginnen, jedoch schon sehr bald infolge Substratmangels wieder zum Stillstand kommen müssen.

Die Nebenproduktbildung des homofermentativen *St. diacetylactis* paßt nicht ganz in das bisherige Schema. Diacetyl scheint nämlich ein normales Stoffwechselprodukt dieses Stammes zu sein. (Daher die Verwendung als sog. Säurewecker in der Molkereiindustrie, denn Diacetyl ist die Hauptkomponente des Butteraromas.)

Die Acetoinbildung dagegen scheint auch mit einem Pyruvatstau gekoppelt zu sein, was einen niedrigen NADH-Spiegel voraussetzt. Der trotz Zugabe von Pyruvat und Acetaldehyd sich nicht verändernde Acetoin Spiegel erklärt sich durch die zu geringen Mengen, die zugegeben wurden, mehr wirkte bereits hemmend. Gleiches gilt für Malat. Der zusätzliche Wasserstoffkreislauf vermag wohl das anfallende Pyruvat zu metabolisieren, so daß Acetoin nicht zunimmt.

*L. plantarum* verhält sich wiederum anders als die bisher diskutierten Stämme. Bei 2% Glucose im Medium bildet er bereits 160 mg/l Acetoin und weist einen zeitweiligen Pyruvatstau von 120 mg/l auf, was Anlaß zu weiteren Regulationsuntersuchungen gab (ESCHENBRUCH u. DITTRICH, 1970). Dieser auf den ersten Blick den bisherigen Ergebnissen und Vorstellungen widersprechende Sachverhalt läßt sich jedoch in das Regulationsschema der Acetoin synthese einordnen.

Wenn man annimmt, daß ein Teil des bei der Triosephosphatdedehydrierung gewonnenen NADH für andere Stoffwechselprozesse verbraucht wird, so fehlt dieser Anteil zur sofortigen und vollständigen Reduktion der anfallenden Brenztraubensäure. Die Triosephosphatdehydrierung läuft jedoch unvermindert intensiv, da genügend NAD durch die Milchsäurebildung und die übrigen NADH verbrauchenden Stoffwechselreaktionen nachgeliefert wird. Pyruvat staut sich somit als Folge dieses NADH-Mangels an, und die Acetoinbildung erreicht entsprechende Größenordnungen. Diacetyl ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar.

Die Größe des Rückstaus könnte sich zum Teil auch dadurch erklären, daß die homofermentative Milchsäuregärung hauptsächlich Milchsäure als Gärungsendprodukt aufweist, die heterofermentative jedoch neben Milchsäure in annähernd äquimolaren Mengen auch Essigsäure, Äthanol und CO<sub>2</sub>. Pyruvat wird somit im letzteren Fall auch noch in andere Stoffwechselkanäle geschleust: reduziert oder oxidiert. Die *Leuconostoc*-Stämme zeigen aus diesem Grunde bei Substrat-Glucose weder einen Pyruvatstau noch eine Acetoinbildung.

Die Zugabe von Metaboliten zu glucosefreiem Substrat könnte als weitere Stütze für die Vorstellungen über die Regulation der Acetoin synthese gewertet werden. Wasserstoffdonator ist in diesem Falle nicht Glucose, sondern Malat, dessen Metabolisierung einen ähnlichen Wasserstoffkreislauf induzieren könnte wie bei *Leuconostoc*. Die nur unter diesen Bedingungen nachweisbare Diacetylbildung kann wiederum mit stark vermindertem Wachstum und zusätzlich hohem Angebot von Pyruvat und Acetaldehyd erklärt werden.

Insgesamt zeigt sich folgendes:

1. Im Grundsätzlichen scheint bei allen untersuchten Stämmen der gleiche Regulationsmechanismus für die Acetoin synthese zu bestehen. Ein hoher NAD/NADH-Quotient könnte die Voraussetzung dafür sein. Das Ausmaß dieser Synthese hängt jedoch entscheidend von der Menge des verfügbaren, d. h. angestauten Pyruvates ab. Dieser Rückstau kann bei verschiedenen Organismen aufgrund ihrer differierenden Abbauege (Glycolyse oder Phosphoketolase-Weg) unterschiedlich groß sein.

2. Ein großer NAD/NADH-Quotient kann auf verschiedene Weise entstehen. Denn abhängig vom jeweiligen Abbauege ist eine sehr unterschiedliche Substratzusammensetzung nötig, um einen hohen NADH-Spiegel zu erhalten. Der eigentliche Unterschied in der Acetoinbildung bei den einzelnen Milchsäurebakteriengattungen scheint in dem Weg zu bestehen, der zu einem niedrigen NADH-Spiegel führt.

3. Die Diacetylbildung läuft mit der Acetoinbildung nicht parallel. Dies kann als Hinweis dafür dienen, daß sich beide Synthesewege unterscheiden. Voraussetzung könnte neben einem Substratüberangebot (Pyruvat, Acetaldehyd) ein Acetyl-CoA-Überschuß sein, der möglicherweise unter stark reduzierten Wachstumsbedingungen auftreten kann.

4. Eine Wachstumsabhängigkeit der Nebenproduktbildung, wie sie für Hefen gegeben scheint, besteht für *Leuconostoc* und *Streptococcus* nicht, für *Lactobacillus* offenbar doch. Das Ausmaß der Acetoin synthese hängt für den letzteren Stamm von der Wachstumsrate ab.

Schließlich sei noch auf einige praktische Gesichtspunkte eingegangen:

Das Kriterium vieler Untersuchungen und auch empirischer Hinweise aus der Praxis ist die oftmals kaum wahrnehmbare Trübung eines Weines nach einem mikrobiellen Säureabbau. Es läßt sich zwar eine gewisse Stoffwechselaktivität dieser Bakterien nachweisen, z. B. am zunehmenden Milchsäure-, am abnehmenden Malatgehalt und an organoleptischen Veränderungen (Milchsäureton), eine starke Zell-

vermehrung unterbleibt aber. Wenn eine Infektion nur durch einige wenige Zellen stattgefunden hat, so ist eine Vermehrung um mehrere Zehnerpotenzen mit bloßem Auge nicht wahrnehmbar. Diese dennoch geringfügige Zellvermehrung ist vergleichbar mit den Verhältnissen bei *Leuconostoc*, wenn das Substrat glucosefrei ist: Nebenproduktbildung und Malatabbau bei nur geringfügiger Zellvermehrung.

Das geschmacklich stark ausgeprägte Diacetyl (Schwellenwert etwa 0,3—0,5 mg/l) wird unter erschwerten Wachstumsbedingungen gebildet, wenn die Bakterien sich kaum vermehren können. Derartig erschwerende Verhältnisse sind in einem Wein von Natur aus gegeben: niedriger pH-Wert, oftmals wenig Zucker und Äpfelsäurekonzentrationen von 5—7 g/l, deren Metabolisierung z. B. durch heterofermentative Stämme erhöhte Diacetylbildung zur Folge haben kann.

Ein weiteres Kriterium, das oft aus der Praxis berichtet wird, ist der unter Umständen über Monate sehr langsam ablaufende Säureabbauprozeß. Auch dies wird verständlich, wenn die pH-Verhältnisse betrachtet werden.

Moste und Weine weisen durchschnittliche pH-Werte von 3—3,5 auf. *Lb. plantarum* kann sich z. B. noch bei einem pH-Wert von 3,6 vermehren. Durch den Äpfelsäureabbau nimmt der Säuregrad etwas ab. Die Lebensbedingungen werden für den Organismus günstiger. Unter diesen Umständen kann es zu einer durchaus wahrnehmbaren Trübung eines Weines kommen. Von der im Wein noch verfügbaren Glucose, vom Pyruvat, Acetaldehyd sowie von Aminosäuren und anderen Wachstumsfaktoren hängt dann entscheidend das Ausmaß der Nebenproduktbildung ab. Die Konzentrationen dieser Stoffe können beträchtlich schwanken. Faktoren wie Weinbereitungstechnik, Sorte, Lage und Klima sorgen von Fall zu Fall für andere Ausgangsbedingungen. Die Vielfalt deutscher Lagen- und Sortenspezifitäten ist ein Hinweis für diese Tatsache.

Entsprechend variabel ist auch das Bild vom infizierenden Organismus her betrachtet. Die Untersuchung von nur vier Bakterienstämmen zeigt bereits, daß die eine Nebenproduktsynthese auslösenden Momente zwar ähnlich sind, das Ausmaß einer Synthese aber von sehr unterschiedlichen Gegebenheiten abhängen kann. Da von allen Gattungen der Milchsäurebakterien Stämme aus Wein isoliert werden konnten, sind in diesem Sinne weitere Differenzierungen zu erwarten.

Verständlich wird hieraus das Scheitern aller Versuche, die biologische Entsäuerung praxisgerecht, d. h. kontrollierbar durchzuführen. Verständlich wird weiterhin die große Zahl oft rein deskriptiver Arbeiten, die immer wieder von anderen Bedingungen und Beeinflussungsfaktoren berichten, z. B. FORNACHON (1964), GUYMON u. CROWELL (1965), KUNKEE (1967).

Verständlich werden auch die großen Schwankungen der Acetoingehalte (3,0—32,0 mg/l) fehlerhafter Weine, wie sie z. B. DITTRICH u. KERNER (1964) sowie KIELHÖFER u. WÜRDIG (1960) feststellten. Wenn dem gegenüber noch die Diacetylwerte dieser Weine nicht gleichsinnig schwanken, d. h. einem hohen Acetoinwert steht kein vergleichbar hoher Diacetylwert gegenüber, so erklärt sich das sowohl durch die unterschiedlichen Synthesewege von Acetoin und Diacetyl, als auch durch das unterschiedliche Stoffwechselverhalten homo- und heterofermentativer Stämme. Die Bestimmung beider Nebenprodukte als eine Substanz (z. B. RADLER, 1962) verlieren unter diesen Gesichtspunkten an Aussagewert. Weitere Untersuchungen sind für tiefere Einblicke abzuwarten.

Herrn Prof. Dr. H. H. DITTRICH, Geisenheim, möchte ich danken für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut. Der Forschungsring des Deutschen Weinbaues bei der DLG half mit einer Sachbeihilfe.

### Zusammenfassung

Mit je zwei homo- und heterofermentativen Milchsäurebakterien wurde die Acetoin- und Diacetylbildung in Abhängigkeit von Substratveränderungen untersucht.

1. *L. citrovorum* und *L. mesenteroides* bilden nur auf glucosefreiem Substrat Acetoin und Diacetyl. Malat, Pyruvat und Acetaldehyd steigern die Nebenproduktsynthese.
2. *St. diacetylactis* bildet in glucosehaltigem Substrat nur Diacetyl, in glucosefreiem dagegen nur Acetoin. Die Zugabe von Metaboliten beeinflusst in den verwendeten Konzentrationen die Nebenproduktbildung nicht.
3. *Lb. plantarum* bildet in glucosehaltigem Medium bis zu 160 mg/l Acetoin und kein Diacetyl. Im Gegensatz zu den anderen Stämmen ist die Acetoinbildung wachstumsabhängig. Durch Zugabe von Malat, Pyruvat und Acetaldehyd zu glucosefreiem Substrat nimmt das an sich stark reduzierte Wachstum zu und entsprechend Acetoin. Unter diesen Bedingungen wird Diacetyl synthetisiert.
4. Für die Acetoinbildung wird folgender Regulationsmechanismus diskutiert: Ein großer NAD/NADH-Quotient könnte einen Pyruvatstau verursachen, die Voraussetzung für eine Acetoin synthese. Über die Größe des Quotienten entscheidet die Art des Glucoseabbaues. In glucosefreiem Substrat entscheiden Pyruvat-, Acetaldehyd- und Malatgehalt über das Ausmaß an Acetoin.
5. Die Diacetylsynthese folgt einem anderen Regulationsschema. Extrem reduzierte Wachstumsbedingungen könnten auslösendes Moment sein.
6. Praktische Gesichtspunkte werden diskutiert.

### Literaturverzeichnis

- BOEHRINGER, C. F. & Söhne, Firmenschrift: Enzymatische Analysen für die Lebensmittelchemie. Mannheim 1964.
- : Biochemica Test Combinationen für enzymatische und klinisch-chemische Testmethoden, 2. Auflage, Mannheim 1966.
- BUSSE, M. und KANDLER, O., 1961: Über die Biosynthese des Acetoin bei *Leuconostoc citrovorum*. Zentralbl. Bakteriologie, II. Abt. 114, 675—682.
- CHUANG, L. F. und COLLINS, E. B., 1968: Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast. J. Bacteriol. 95, 2083—2089.
- DE MAN, J. C., ROGOSA, M. und SHARPE, M. E., 1960: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 23, 130—135.
- DITTRICH, H. H. und KERNER, E., 1964: Diacetyl als Weinfehler. Ursache und Beseitigung des „Milchsäuretones“. Wein-Wiss. 19, 528—535.
- und ESCHENBRUCH, R., 1965: Untersuchungen zur Acetoinbildung bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*. Arch. Mikrobiol. 52, 345—352.
- , 1968: Die Acetoin synthese der Hefe bei anaerob/aerob-Wechsel und  $\text{NH}_4^+$ -Zusatz. Arch. Mikrobiol. 63, 63—69.
- DOLIN, M. I. und GUNSAUS, I. C., 1951: Pyruvic acid metabolism. II. An acetoin-forming enzyme system in *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 62, 199—214.
- ESCHENBRUCH, R. und DITTRICH, H. H., im Druck: Die Acetoinbildung von *Lactobacillus plantarum* in Abhängigkeit von Thiamin, Liponsäure, L-Valin und L-Isoleucin. Arch. Mikrobiol.
- FORNACHON, J. C. M., 1964: A *Leuconostoc* causing malo-lactic-fermentation in Australian wines. Amer. J. Enol. Viticult. 15, 184—186.
- GUYMON, J. F. und CROWELL, E. A., 1965: The formation of acetoin and diacetyl during fermentation, and levels found in wines. Amer. J. Enol. Viticult. 16, 85—91.
- HENNIG, K., 1964: Chemische Untersuchungsmethoden für Weinbereiter und Süßmosthersteller. Verl. E. Ulmer, Stuttgart.
- HOLZER, H. und BEAUCAMP, K., 1961: Nachweis und Charakterisierung von  $\alpha$ -Lactyl-Thiaminpyrophosphat („Aktives Pyruvat“) und  $\alpha$ -Hydroxyäthyl-Thiaminpyrophosphat („Aktiver Acetaldehyd“) als Zwischenprodukte der Decarboxylierung von Pyruvat mit Pyruvatdecarboxylase aus Bierhefe. Biochim. biophys. Acta 46, 225—243.

- , FONSECA-WOLLHEIM, F. DA, KOHLHAW, G. and WOENCKHAUS, CH. W., 1962: Active forms of acetaldehyde, pyruvate, and glycolic aldehyde. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **98**, 453—465.
- JUNI, E. and HEYM, G. A., 1956: Cyclic pathway of the bacterial dissimilation of 2,3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. *J. Bacteriol.* **72**, 746—756.
- KIELHÖFER, E. und WÜRDIG, G., 1960: Die Bestimmung von Acetoin und Diacetyl im Wein und der Gehalt deutscher Weine an diesen Substanzen. *Wein-Wiss.* **15**, 135—146.
- KUNKEE, R. E., 1967: Control of malo-lactic-fermentation induced by *Leuconostoc citrovorum*. *Amer. J. Enol. Viticult.* **18**, 71—77.
- LOWRY, O. H., ROSEBOURGH, M. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J., 1951: Protein-measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**, 269—275.
- RADLER, F., 1962: Die Bildung von Acetoin und Diacetyl durch die Bakterien des biologischen Säureabbaues. *Vitis* **3**, 136—143.
- — —, 1966: Die mikrobiologischen Grundlagen des Säureabbaues im Wein. *Zentralbl. Bakteriol.*, II. Abt. **120**, 237—287.
- REBELEIN, H., 1961: Kolorimetrisches Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Weinsäure und Milchsäure in Wein und Most. *Dt. Lebensm.-Rundsch.* **57**, 36—41.
- SCHREIBER, G., KOHLHAW, G., GOEDDE, H. und HOLZER, H., 1963: Die Biosynthese des Acetoin im Schweineherzmuskel. *Biochem. Z.* **339**, 83—93.
- SEITZ, W. E., SANDINE, W. E., ELLIKER, P. R. and DAY, E. A., 1963: Studies on diacetyl biosynthesis by *Streptococcus diacetilactis*. *Can. J. Microbiol.* **9**, 431—441.
- SPECKMAN, R. A. and COLLINS, E. B., 1966: Biosynthesis of diacetyl by *Streptococcus diacetilactis*. *Bact. Proc.* **6**.
- , 1968: Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.* **95**, 174—180.

Eingegangen am 2. 2. 1970

Dr. R. ESCHENBRUCH  
z. Zt. Research Institute for  
Oenology and Viticulture  
Stellenbosch  
Rep. of South Africa